

PCT

ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE  
Bureau international



21

DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

<b>(51) Classification internationale des brevets <sup>5</sup> :</b> <b>C12P 21/08, G01N 33/577</b> <b>A61K 39/395, 45/05</b>	<b>A1</b>	<b>(11) Numéro de publication internationale: WO 91/12332</b> <b>(43) Date de publication internationale: 22 août 1991 (22.08.91)</b>
<b>(21) Numéro de la demande internationale:</b> PCT/FR91/00121 <b>(22) Date de dépôt international:</b> 14 février 1991 (14.02.91) <b>(30) Données relatives à la priorité:</b> 90/01769 14 février 1990 (14.02.90) FR <b>(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US):</b> INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE [FR/FR]; 101, rue de Tolbiac, F-75654 Paris Cédex 13 (FR). <b>(72) Inventeurs; et</b> <b>(75) Inventeurs/Déposants (US seulement) :</b> HUYNH THIEN DUC, Guy [FR/FR]; 19, bd Maxime-Gorki, F-94800 Villejuif (FR). RUCAY, Pierre [FR/FR]; 16, rue Ancelle, F-92200 Neuilly-sur-Seine (FR). KOURILSKY, Philippe [FR/FR]; 26, rue de Montpensier, F-75001 Paris (FR).		<b>(74) Mandataires:</b> GUTMANN, Ernest etc. ; ERNEST GUTMANN-YVES PLASSERAUD S.A., 67, boulevard Haussmann, F-75008 Paris (FR). <b>(81) Etats désignés:</b> AT (brevet européen), BE (brevet européen), CA, CH (brevet européen), DE (brevet européen), DK (brevet européen), ES (brevet européen), FR (brevet européen), GB (brevet européen), GR (brevet européen), IT (brevet européen), JP, LU (brevet européen), NL (brevet européen), SE (brevet européen), US. <b>Publiée:</b> <i>Avec rapport de recherche internationale.</i> <i>Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.</i>
<b>(54) Title:</b> MONOCLONAL ANTIBODIES FOR RECOGNIZING A PEPTIDE LINKED TO A MAJOR HISTOCOMPATIBILITY ANTIGEN <b>(54) Titre:</b> ANTICORPS MONOCLONAUX RECONNAISSANT UN PEPTIDE ASSOCIÉ À UN ANTIGÈNE MAJEUR D'HISTOCOMPATIBILITÉ <b>(57) Abstract</b> <p>Restricted monoclonal antibodies characterized by their ability to recognize specifically a complex consisting of a peptide which is characteristic of a pathogenic agent antigen or a cell derangement, and a Major Histocompatibility Complex (MHC) molecule having the ability to recognize and fix this peptide, said antibodies being restricted monoclonal antibodies in that they are unable to recognize said peptide combined with a non peptide specific haplotype MHC molecule. These antibodies can be used to diagnose conditions caused by infectious agents or cell derangements to be found for example in tumors or autoimmune diseases.</p> <b>(57) Abrégé</b> <p>L'invention concerne des anticorps monoclonaux restreints caractérisés par leur capacité à reconnaître spécifiquement un complexe formé par un peptide caractéristique d'un antigène d'un agent pathogène ou un peptide caractéristique d'une dérégulation cellulaire et par une molécule du Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH) ayant la capacité de reconnaître et de fixer ce peptide, lesdits anticorps étant des anticorps monoclonaux restreints, dès lors qu'ils ne reconnaissent pas ledit peptide en association avec une molécule de CMH d'haplotype non spécifique du peptide. Elle vise aussi l'application de ces anticorps au diagnostic de pathologies dues à des agents infectieux ou à des dérèglements cellulaires impliqués par exemple dans des tumeurs ou des maladies autoimmunes.</p>		

**FOR THE PURPOSES OF INFORMATION ONLY**

Codes used to identify States party to the PCT on the front pages of pamphlets publishing international applications under the PCT.

AT	Austria	ES	Spain	MG	Madagascar
AU	Australia	FI	Finland	ML	Mali
BB	Barbados	FR	France	MN	Mongolia
BE	Belgium	GA	Gabon	MR	Mauritania
BF	Burkina Faso	GB	United Kingdom	MW	Malawi
BG	Bulgaria	GN	Guinea	NL	Netherlands
BJ	Benin	GR	Greece	NO	Norway
BR	Brazil	HU	Hungary	PL	Poland
CA	Canada	IT	Italy	RO	Romania
CF	Central African Republic	JP	Japan	SD	Sudan
CG	Congo	KP	Democratic People's Republic of Korea	SE	Sweden
CH	Switzerland	KR	Republic of Korea	SN	Senegal
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SU	Soviet Union
CM	Cameroon	LK	Sri Lanka	TD	Chad
CS	Czechoslovakia	LU	Luxembourg	TG	Togo
DE	Germany	MC	Monaco	US	United States of America
DK	Denmark				

Anticorps monoclonaux reconnaissant un peptide associé à un antigène majeur d'histocompatibilité.

L'invention concerne des anticorps monoclonaux restreints reconnaissant un peptide associé à un antigène majeur d'histocompatibilité. L'invention concerne aussi les applications de ces anticorps au diagnostic et au traitement et le cas échéant à la prévention de certaines pathologies.

On connaît l'intérêt des molécules du Complexe Majeur d'Histocompatibilité (molécules du CMH) en tant que structures membranaires de reconnaissance permettant au système immunitaire de reconnaître le soi du non-soi. Une fonction majeure des molécules de CMH est de présenter des antigènes aux lymphocytes T.

Selon l'appartenance de la molécule du CMH à la classe I ou à la classe II, le complexe formé par la molécule du CMH et l'antigène est reconnu respectivement par des cellules T cytotoxiques ou par des cellules T auxiliaires capables d'activer la synthèse de l'anticorps par les lymphocytes B.

Des travaux ont déjà permis de mettre en évidence l'existence d'anticorps reconnaissant un antigène associé à une molécule de CMH. Par exemple, Van Leuveen et al (J. Exp. Med. (1979) 150, 1075-1083) ont décrit l'existence, chez une malade atteinte d'anémie, d'un sérum polyclonal contenant des anticorps capables de lyser spécifiquement des lymphocytes portant l'antigène H-Y associé à une molécule de CMH du type HLA-A2.

Cependant les résultats connus jusqu'à présent montrent qu'il n'a pas été possible de produire ni d'identifier et de caractériser des anticorps monoclonaux restreints, c'est-à-dire spécifiques du complexe formé par un antigène déterminé et une

molécule de CMH spécifique de cet antigène, également déterminée.

A cet égard, plusieurs équipes ayant tenté de mettre au point des modèles expérimentaux en vue de produire des anticorps monoclonaux restreints, ont publié des résultats négatifs.

Par exemple, l'équipe de Tamminen et al utilisant comme antigène du virus grippal Influenza type A, souche H3N2 (X-31) (Tamminen et al., Eur. J. Immunol. (1987) 17, 999-1006) et également le groupe de Rubin, Malissen, Jorgensen et Zeuthen utilisant comme antigène l'insuline (Rubin et al., Res. Immunol. (1989) 140,...) ont publié des résultats négatifs, c'est-à-dire qu'ils n'ont pas réussi à produire des anticorps restreints. L'équipe de Klinman a décrit des résultats positifs (Wylie et al., J. Exp. Med. (1982) 155, 403-414 ; Frescher and Klinman, J. Exp. Med. (1986) 164, 196-210). Cependant les travaux de Klinman et al. montrent que les anticorps monoclonaux produits reconnaissent des cellules transformées par un virus oncogène SV40, sans que l'antigène reconnu, ni la molécule du CMH impliquée, soient identifiées.

Les difficultés rencontrées pour la préparation des anticorps monoclonaux restreints selon l'invention peuvent être attribuées à différents facteurs et en particulier à la mise au point d'une technique particulière de préparation des anticorps et également à des techniques très sensibles pour le criblage.

Les inventeurs se sont intéressés au rôle que pourraient présenter des anticorps monoclonaux restreints pour le diagnostic mais aussi le traitement de différentes pathologies.

Ils ont été capables de remédier aux difficultés rencontrées jusqu'à présent et ont obtenu des anticorps monoclonaux restreints caractéristiques d'un complexe constitué par un antigène en association avec

une molécule du CMH reconnaissant spécifiquement cet antigène.

L'invention a donc pour objet des anticorps monoclonaux restreints reconnaissant des antigènes associés à des molécules du CMH. Entrent également dans le cadre de l'invention, des souches d'hybridomes productrices des anticorps monoclonaux restreints.

L'invention concerne aussi des compositions pour le diagnostic de la présence d'une infection ou d'un dérèglement cellulaire susceptible de générer un état tumoral ou une maladie autoimmune.

L'invention se rapporte aussi à des compositions pour le traitement d'infections ou de dérèglements cellulaires tels que décrits ci-dessus.

Elle vise de plus un procédé pour la production des anticorps monoclonaux restreints de l'invention.

Les antigènes dont il est question dans les paragraphes précédents et qui constituent l'une des deux entités du complexe reconnu par les anticorps restreints selon l'invention, sont soit des peptides tels qu'issus de la dégradation de protéines provenant d'un agent infectieux ou pathogène soit des peptides issus d'un dysfonctionnement (dérégulation) cellulaire ou encore des protéines dégradées du soi. Ces peptides peuvent par exemple être obtenus par coupure enzymatique par exemple par les enzymes du lysosome ou de l'appareil de Golgi.

La formation du complexe nécessite également que le peptide et la molécule du CMH soient capables de se lier entre elles.

Pour la préparation d'anticorps monoclonaux restreints, ces peptides sont avantageusement obtenus par voie de synthèse chimique selon les méthodes classiques de synthèse des peptides.

Ils peuvent aussi être préparés à partir de protéines naturelles par exemple des protéines issues

d'agents pathogènes ou des protéines mises en jeu lors de dérèglements cellulaires de type tumoral ou de type auto-immun, notamment des protéines mutées.

Les anticorps monoclonaux de l'invention sont caractérisés par leur capacité à reconnaître spécifiquement un complexe formé par un peptide caractéristique d'un antigène d'un agent pathogène ou un peptide caractéristique d'une dérégulation cellulaire et par une molécule du Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH) ayant la capacité de reconnaître et de fixer ce peptide, lesdits anticorps étant des anticorps monoclonaux restreints, dès lors qu'ils ne reconnaissent pas ledit peptide en association avec une molécule de CMH d'haplotype qui ne fixe pas le peptide (non spécifique du peptide).

Pour déterminer la spécificité du couple peptide-molécule du CMH de classe I, on peut effectuer un test tel que décrit par BOUILLLOT et al, (Nature, 1989, vol. 339, p.473-475). Conformément à ce test, un peptide dont on recherche la spécificité vis-à-vis de la molécule de CMH est incubé avec une molécule de CMH connue, sur des cellules marquées avec un isotope radioactif tel que le chrome 51. Après cette incubation, la suspension est mise en présence de lymphocytes cytotoxiques (CTL) spécifiques du peptide. Lorsque les cellules CTL lysent les cellules mises en présence du peptide et de la molécule du CMH, on peut en déduire que la molécule du CMH a une affinité spécifique pour le peptide.

De la même manière, il existe divers tests qui permettent de repérer l'association fonctionnelle et spécifique d'un peptide à un antigène du CMH de classe II. On peut par exemple, mettre en oeuvre le test de Sette et al (P.N.A.S. (1989), Vol. 86, p3296-3300).

Les anticorps ci-dessus définis sont désignés par le terme anticorps monoclonaux restreints.

Selon un mode de réalisation particulier de l'invention, les anticorps monoclonaux restreints sont encore caractérisés en ce qu'ils sont dépourvus ou pratiquement dépourvus de réaction à l'égard du peptide contre lequel ils sont dirigés, présent à l'état isolé et/ou en ce qu'ils reconnaissent faiblement ou pas du tout, la molécule du CMH seule.

Un anticorps pratiquement dépourvu de la capacité à reconnaître un peptide seul est selon l'invention, un anticorps qui présente avec ce peptide une réaction inférieure à deux fois le signal correspondant au bruit de fond.

Un anticorps reconnaissant faiblement une molécule de CMH seule reconnaît cette molécule de CMH suivant une réaction qui est de l'ordre de  $1/10$  à  $1/5$  de la réaction existant dans les mêmes conditions avec le complexe peptide-CMH spécifique.

Pour déterminer si un anticorps monoclonal obtenu répond aux définitions de l'invention, une réaction immunoenzymatique de type ELISA, telle que décrite ci-après à titre d'exemple, peut être réalisée.

La réaction immunoenzymatique est effectuée d'abord au moyen du réactif à base d'anticorps conjugué anti-Ig de souris couplé soit à l'uréase, soit à la phosphatase alcaline, sur un surnageant de culture d'hybridomes. La réaction est ensuite confirmée par l'anticorps conjugué anti-Ig de souris couplé par exemple à la phosphatase alcaline. Les cellules servant de cibles sont par exemple des cellules spléniques préalablement incubées avec le peptide contre lequel on veut former les anticorps ( $5$  à  $50\mu\text{g/ml}$  pour  $10^7$  cellules à  $37^\circ\text{C}$  pendant une à deux heures). Les cellules sont fixées sur plaques de polyvinyle selon la technique décrite par Ternynck et Avrameas (Ternynck et Avrameas: Techniques immuno-

enzymatiques - Les éditions INSERM, 1987) au moyen du poly-L-lysine.

Des témoins utilisés pour vérifier l'appartenance des anticorps monoclonaux restreints à l'invention et qui par conséquent ne doivent pas donner une réaction positive avec les anticorps monoclonaux restreints de l'invention sont constitués d'une part par l'un ou l'autre des constituants pris séparément, à savoir le peptide contre lequel on souhaite former des anticorps monoclonaux restreints ou les cellules portant la molécule du CMH correspondante seule sans ledit peptide, et d'autre part par l'un ou l'autre de ces constituants en association avec un partenaire non relié c'est-à-dire non spécifique (le peptide différent de celui contre lequel on veut obtenir des anticorps monoclonaux restreints associé à la molécule de CMH étudiée ou le peptide contre lequel on souhaite produire des anticorps monoclonaux restreints, associé à une molécule du CMH non spécifique).

La réaction positive ci-dessus est marquée par une densité optique (D.O) supérieure à au moins deux fois celle observée pour les puits qui contiennent tous les composants de la réaction excepté les anticorps restreints.

Les anticorps monoclonaux restreints de l'invention, ont l'avantage de présenter une sélectivité importante ce qui les rend particulièrement intéressants dans leur application au diagnostic, au traitement et le cas échéant à la vaccination.

Les peptides reconnus par les anticorps de l'invention peuvent être caractéristiques d'agents pathogènes tels que des virus, des bactéries, des parasites, par exemple le plasmodium ou des champignons notamment des levures pathogènes.



Il peut s'agir également des peptides représentant des antigènes mineurs d'histo - compatibilité, de peptides caractéristiques de dérèglements cellulaires de type tumoral ou cancéreux ou encore de type auto-immun.

Selon un mode de réalisation préféré de l'invention, les anticorps monoclonaux restreints sont caractérisés en ce que les peptides reconnus présentent de 7 à 25, de préférence une dizaine d'acides aminés.

Pour la présentation de certains antigènes par les molécules du CMH, la présence d'un peptide ayant une longueur en acides aminés voisine de ce qui est donné dans ce qui précède peut suffire à la réaction de fixation avec les molécules de CMH et à celle de reconnaissance par les anticorps de l'invention.

Pour la préparation et la détermination des anticorps monoclonaux restreints selon l'invention on peut également avoir recours à des antigènes constitués par un peptide associé à une forme solubilisée et/ou soluble de la molécule de CMH qui lui est spécifique pour une espèce donnée. Dans le cas de l'utilisation de la forme solubilisée, celle ci est préparée par solubilisation avec un détergent ionique tel que le triton X100 ou le NP40 ou avec un détergent non ionique tel que l'octyl - $\beta$ D-glycopyranoside, la solubilisation étant suivie d'une chromatographie d'affinité. Pour préparer la molécule sous forme solubilisée on se réfèrera à la technique décrite par STALLCUP K et al (J. of Immunology, 1981, vol. 127, page 923).

Dans le cas de l'utilisation de la molécule soluble de CMH celle ci est obtenue dépourvue de sa partie transmembranaire par génie génétique.

Cette molécule soluble peut être préparée par un hôte cellulaire modifié par insertion du gène codant

pour la molécule de CMH que l'on souhaite exprimer, ce gène étant dépourvu de la séquence codant pour la partie transmembranaire de la molécule. Compte tenu de la suppression de cette séquence, on lie la chaîne lourde et la chaîne légère de la molécule de CMH avec un polylinker de type GGGS. Le gène est incorporé dans l'hôte dans des conditions telles que ses éléments de régulation sont reconnus par l'hôte cellulaire. Un hôte cellulaire approprié est par exemple une cellule d'insecte.

Des anticorps monoclonaux restreints particuliers sont caractérisés en ce que le peptide reconnu est spécifique d'un rétrovirus humain HIV et notamment en ce qu'il s'agit des peptides de la protéine gag par exemple le peptide gag5 (GHQAAMEMLKE) ou le peptide gag p25 synthétisé par Neosystem (Strasbourg, référence SP89-158) (séquence 263-277), ou des peptides de la protéine interne p14 (nucléoprotéine) notamment le peptide K16F décrit par Claverie JM et al dans Eur jour Imm 1988 vol 18 p 1547-1553.

D'autres anticorps monoclonaux restreints selon l'invention sont dirigés contre des peptides tels que les suivants :

- .le peptide de l'autoantigène de la protéine basique de myéline MPB 1 à 11 décrit par Wraith.D et al dans (Cell 1989 vol. 59 p 247-255),
- .le peptide de la sous-unité  $\alpha$  du récepteur de l'acétylcholine décrit par Mozes et al (EMBO journal 1989 vol 8 p 4049-4052),
- .le peptide de la chaîne  $\alpha$  de l'insuline décrit par Gradehandt et al, (Immunological Reviews, (1988) vol. 106, p59 à 75),
- .le peptide de l'enveloppe du virus de l'hépatite B, Chisari et al (Cell 1989 vol 59 p 1145-1156).

Des anticorps selon l'invention peuvent aussi être caractérisés en ce que la molécule du CMH humain

reconnue est de divers haplotypes (par exemple HLA-A2, HLA-A3, HLA-B7, HLA-B12, HLA-B27, HLA-B37, HLA-CW3) de classe I comme de classe II (par exemple HLA-DR2, HLA-DR3, HLA-DR4, HLA-DR5).

Un anticorps monoclonal restreint particulier selon l'invention est l'anticorps qui reconnaît un peptide de la protéine p25 (gag) de HIV, notamment le peptide gag5, en association avec une molécule de CMH d'haplotype HLA-B27 ou HLA-A11.

L'invention concerne aussi un procédé pour la préparation d'anticorps monoclonaux restreints de l'invention. Un premier procédé adapté à la production de ces anticorps monoclonaux restreints est caractérisé en ce que:

- on fusionne des cellules spléniques d'un animal préalablement immunisé avec des cellules spléniques isogéniques recouvertes d'un peptide déterminé, avec des cellules de myélome en présence d'un promoteur de fusion, par exemple le polyéthylène glycol, les cellules spléniques étant en excès par rapport aux cellules myélomateuses, par exemple dans une proportion de 10 pour 1 environ,
- on réalise un criblage afin de sélectionner ceux des hybridomes capables de produire des anticorps monoclonaux restreints, par exemple par la technique ELISA, effectuée avec un réactif à base d'anticorps conjugué anti-Ig de souris couplé à une enzyme par exemple l'uréase, ou la phosphatase alcaline ou la peroxydase,
- on récupère et on clone les hybridomes ainsi sélectionnés.

Une autre technique telle que la technique par la cytotoxicité peut être utilisée pour le criblage.

Entrent également dans le cadre de l'invention les hybridomes producteurs des anticorps monoclonaux restreints ci-dessus. Ces hybridomes sont les produits

de fusion de cellules de myélomes et de cellules spléniques d'un animal préalablement immunisé avec le peptide-antigène, dans des conditions telles que l'antigène contre lequel sont formés les anticorps, est constitué par un complexe comportant le peptide ci-dessus associé à une molécule de CMH.

De préférence les hybridomes résultent de la fusion des cellules spléniques ci-dessus décrites avec un myélome de type HGPRT<sup>r</sup> par exemple: X63-Ag8, NS-1 ou SP2/O.

La réalisation des hybridomes est faite d'après le protocole de Kohler et Milstein (Nature, 1974, 256:495- 497).

Les cellules lymphocytaires ou non, normales ou tumorales apportant la molécule de CMH sont de préférence d'haplotype H-2<sup>d</sup>, H-2<sup>b</sup>, H-2<sup>k</sup>, H-2<sup>q</sup> ou H-2<sup>s</sup> chez la souris, mais il pourra s'agir également de cellules exprimant des molécules de CMH humaines (ou d'une autre espèce) chez des souris transgéniques (exprimant le même CMH humain) ou non transgéniques.

L'invention se rapporte aussi à des cellules lymphocytaires ou non, humaines ou animales, par exemple de souris, recouvertes d'un peptide ou d'un polypeptide de préférence immunogène, contre lequel on veut préparer des anticorps monoclonaux restreints.

Un second procédé pour la production des anticorps monoclonaux restreints selon l'invention consiste à réaliser la fusion entre des cellules B du sang immortalisées avec le virus d'Epstein Barr et des lymphocytes B humains préalablement mis en contact avec des peptides contre lesquels on cherche à former des anticorps monoclonaux restreints.

Les cellules B préalablement mises au contact des peptides contre lesquels on cherche à former des anticorps monoclonaux, peuvent être prélevées dans le sang périphérique d'un donneur préalablement immunisé

avec le peptide, lorsqu'il n'est pas toxique pour ce donneur. Ces lymphocytes B peuvent aussi être obtenus par culture in vitro au contact des peptides, la récupération des cellules B recouvertes de peptides étant précédée d'un ou plusieurs cycles de stimulation.

Enfin, les anticorps restreints ou des molécules analogues telles que la partie Fab de ces anticorps, ou des analogues des récepteurs des cellules T ayant la capacité de reconnaître le complexe CMH-peptide peuvent être obtenus dans E.coli ou d'autres micro-organismes, selon les techniques de Huse et al (Science, (1989), 246, 1275), Ward et al (Nature, (1989), 341, 544) Bird et al (Science, (1988), 242, 423); ou d'autres auteurs.

Conformément à ces techniques, on introduit à l'aide de vecteurs appropriés, les gènes amplifiés par la technique PCR, codant pour les anticorps monoclonaux restreints ou les gènes codant pour les récepteurs de cellules T spécifiques murins ou humains ou d'autres espèces, dans E.coli, dans des conditions permettant leur expression. Puis, on réalise un criblage afin de déterminer celles des molécules exprimées qui présentent la spécificité requise pour la reconnaissance du complexe peptide-molécule du CMH. Le criblage peut être effectué selon la méthode décrite précédemment.

La technique ci-dessus peut également être mise en oeuvre en introduisant des séquences de gènes codant pour les anticorps restreints ou les récepteurs de cellules T spécifiques, ou encore des mutants de ces séquences.

Les gènes ou fragments de gènes codant pour les anticorps monoclonaux restreints sont obtenus par extraction de l'ADN des cellules immunes, dont la préparation est décrite ci-dessus.

L'invention se rapporte donc à des anticorps ou à des analogues, produits dans E.coli ou dans d'autres micro-organismes, à des anticorps monoclonaux restreints humains ou d'autres espèces (par exemple obtenus chez le rat ou le hamster par des techniques analogues à celles décrites précédemment ou obtenus selon les méthodes de Borrebaeck et al, P.N.A.S. (1988), vol. 85, p.3995-3999).

Les anticorps de l'invention présentent un grand intérêt pour différentes applications. Ils peuvent être utilisés par exemple pour des applications au diagnostic d'infections ou pour le diagnostic de dérèglements cellulaires tels qu'ils se manifestent dans certains cancers ou maladies autoimmunes.

L'invention se rapporte à cet égard à une composition pour le diagnostic de la présence de peptides associés à des molécules de CMH dans un échantillon biologique testé, caractérisée en ce qu'elle comprend des anticorps monoclonaux restreints tels que décrits précédemment.

Cette composition de diagnostic peut être mise en oeuvre soit sur un échantillon biologique, soit dans un organisme vivant.

Selon cette dernière application, on aura recours aux techniques de diagnostic pratiquées en imagerie médicale.

Dans cette hypothèse, l'anticorps monoclonal restreint est marqué par une substance radioactive ou par une substance pouvant être rendue visible par les techniques de fluorochrome ou de LASER.

Pour le diagnostic d'une pathologie déterminée, dans laquelle interviennent des antigènes tels que décrits précédemment, il est nécessaire de prendre en considération l'haplotype des molécules du CMH présentes chez le patient chez lequel est réalisée la détection.

L'invention vise aussi un kit pour le diagnostic in vitro sur un échantillon biologique d'une infection par un organisme pathogène ou pour le diagnostic d'un cancer, d'une maladie autoimmune ou d'un autre dérèglement cellulaire, caractérisé en ce qu'il comprend:

- des anticorps monoclonaux restreints selon l'invention, ayant la spécificité recherchée compte tenu du diagnostic à effectuer,
- des moyens pour révéler la présence d'un conjugué de type complexe (antigène-molécule ou peptide-molécule du CMH) lié avec l'anticorps.

L'échantillon biologique utilisé est avantageusement un échantillon de sérum ou tout autre fluide biologique.

Entre également dans le cadre de l'invention un test pour la détection in vitro d'une infection ou d'un dérèglement cellulaire, comprenant les étapes suivantes:

- mise en contact de l'échantillon biologique avec des anticorps selon l'invention,
- détection de la présence d'un conjugué du type anticorps-complexe (antigène-molécule ou peptide-molécule du CMH).

L'application au diagnostic, des anticorps de l'invention peut être utilisée pour détecter un virus tel que le virus HIV du SIDA, ou encore pour détecter des tumeurs ou des dérèglements autoimmuns.

Selon un mode de réalisation de l'invention on peut aussi rendre les anticorps monoclonaux restreints cytotoxiques.

Les anticorps de l'invention peuvent alors entrer à titre de principe actif dans une composition pharmaceutique pour le traitement des infections ou des dérèglements ci-dessus par exemple par compétition notamment dans le cas où ils ne sont pas cytotoxiques.

Dans ce cas, ils sont mélangés avec un véhicule pharmaceutique acceptable.

Des substances capables de rendre les anticorps cytotoxiques sont des toxines, des antibiotiques, des isotopes radioactifs.

De tels anticorps peuvent être utilisés en immunothérapie.

L'invention vise aussi une composition pharmaceutique, caractérisée en ce qu'elle comprend, à titre de principe actif, des anticorps monoclonaux restreints conformes à l'invention. De tels anticorps formulés dans une composition pharmaceutique pourraient être utilisés notamment comme agents compétiteurs pour bloquer l'action de cellules T spécifiques, particulièrement dans des pathologies autoimmunes.

Entre également dans le cadre de l'invention l'application des anticorps monoclonaux restreints à titre de vaccin, pour stimuler la production d'anticorps anti-idiotypiques notamment dans le cas des maladies autoimmunes.

Des compositions vaccinales selon l'invention comprennent donc à titre de principe actif, des AcM restreints ci-dessus décrits. Les anticorps anti-idiotypiques produits par l'injection des AcM restreints reconnaissent et éliminent les cellules T autoréactives.

D'autres caractéristiques et avantages de l'invention apparaissent dans les exemples qui suivent.

#### EXEMPLES

#### ETABLISSEMENT DES HYBRIDOMES SECRETANT DES ANTICORPS DE TYPE RESTREINT.

##### Immunisation

Des souris de lignée BALB/c (H-2<sup>d</sup>) sont immunisées par injection intra-péritonéale i.p. de



cellules spléniques isogéniques couvertes de peptide. Il s'agit en l'occurrence du peptide de la nucléoprotéine du virus grippal dénommé NP147-158R. Les cellules spléniques sont incubées au préalable avec le peptide à raison de  $10^7$  cellules pour  $100\mu\text{g}$  de peptide dans un volume de 1ml de milieu de culture (DMEM + 2% de sérum de veau foetal). L'incubation se fait dans une étuve à  $\text{CO}_2$  (5%) pendant 1 heure. Les souris reçoivent 3 injections intra-péritonéales à raison d'une injection par semaine. Un intervalle de 3 semaines sépare la 3ème de la 4ème injection qui précède le sacrifice et le prélèvement de la rate. Trois jours séparent la 4ème injection du prélèvement de la rate. La 4ème injection se fait par deux voies: 0,5ml de la suspension est injectée par voie intra-péritonéale, 0,5ml par voie intra-veineuse.

#### Fusion cellulaire

Les cellules spléniques sont obtenues à partir de la rate après dissociation en milieu DMEM + 5% de sérum de veau foetal. Les globules rouges sont lysés au moyen du chlorure d'ammonium ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) à 0,83% et les lymphocytes sont ensuite lavés trois fois en DMEM + 5% de sérum de veau foetal.

Le partenaire de fusion est constitué par 3 myélomes HGPRT<sup>-</sup>, à savoir X63-Ag8, NS-1 et SP2/0. Autrement dit, les lymphocytes sont fusionnés soit avec le myélome X63, NS-1 ou SP2/0 séparément. La fusion se fait au moyen du polyéthylène glycol (PEG 1500) de la firme MERCK, à raison de 10 lymphocytes pour une cellule de myélome. Le protocole est basé sur celui décrit par Köhler et Milstein (Nature, 1974, 256:495-497) rappelé ci-après: les lymphocytes et les cellules de myélome (X63, NS-1 et SP2/0) sont mis ensemble dans la proportion indiquée en haut. Les trois préparations (lymphocytes plus X63 ou plus NS-1 ou plus SP2/0) sont centrifugées pendant 10 minutes à

16

250g et à 4°C. Les surnageants sont enlevés en laissant cependant un film de liquide au-dessus du culot cellulaire. Les tubes sont mis à 37°C dans un bain marie. On ajoute goutte à goutte 1ml d'une solution de polyéthylène glycol 1500 (solution de 50% de PEG 1500 dans RPMI à pH 7) sur le culot cellulaire. L'opération devant durer 1 minute, est suivie par l'addition de 20ml de DMEM plus 10% de sérum de veau foetal. Le tout est laissé encore trois minutes dans le bain marie à 37°C puis les tubes sont centrifugés pendant 15 minutes à 250g et à +4°C. Les surnageants sont enlevés et les cellules sont lavées une fois avec 20ml de DMEM +10% de sérum de veau foetal. Les cellules sont remises ensuite dans une solution de DMEM plus 10% de sérum de veau foetal auquel est ajouté le milieu HAT (solution mère HAT 100X: Hypoxanthine à 1,36mg/ml, Aminoptérine à 0,018mg/ml et Thymidine à 0,76mg/ml). Les suspensions cellulaires sont distribuées dans les puits de plaques de culture en plastique (NUNCN, 96 puits) à raison de 200 µl par puits et contenant 10.000 cellules. On ajoute ensuite 50.000 cellules spléniques normales, ou de préférence de cellules spléniques normales irradiées à 300 rad, dans chaque puits à titre de "cellules de remplissage". Les cellules sont incubées ainsi pendant 7 à 10 jours dans une étuve à CO<sub>2</sub> (5%) et à 37°C.

#### CRIBLAGE

Au bout de 7 à 10 jours, le surnageant de chaque puits est prélevé et soumis au criblage par la réaction immunoenzymatique "ELISA". Elle est effectuée d'abord au moyen du réactif à base d'anticorps conjugué anti-Ig de souris couplé à l'uréase puis confirmée ensuite par l'anticorps conjugué anti-Ig de souris couplé à la phosphatase alcaline. Les cellules servant de cibles sont des cellules spléniques préalablement incubées avec le peptide NP 147-158R (5

à 50 µg/ml pour 10<sup>7</sup> cellules) à 37°C pendant une à deux heures. Elles sont fixées sur plaques de polyvinyle (Dynatech) selon la technique décrite par Ternynck et Avrameas (Ternynck et Avrameas: Techniques immuno-enzymatiques- Les éditions INSERM, 1987) au moyen du poly-L-lysine.

Les puits ayant donné une valeur en densité optique (D.O) supérieure au moins de deux fois celle du témoin négatif (réaction des cellules cibles avec l'anticorps conjugué sans surnageant de culture) sont sélectionnés. Les surnageants des mêmes puits sont testés aussi sur les cellules non couvertes de peptide et de même haplotype pour s'assurer que la réaction observée n'est pas due aux "autoanticorps". De même le test sur le peptide en question, fixé seul (sans cellules) directement sur la plaque, confirme ainsi que les surnageants sélectionnés réagissent seulement avec les cellules couvertes de peptide.

La sélection étant effectuée, les puits sont soumis à des clônages et sous-clônages pendant 3 à 4 fois. A chaque clonage et sous-clonage, les surnageants sont examinés de nouveau sur les mêmes critères décrits en haut. En même temps, la réaction immunoenzymatique est appliquée pour déterminer l'isotype de l'hybridome. A ce stade est effectuée parallèlement la réaction en vue de déterminer la restriction, autrement dit, la réaction devant être observée seulement avec l'haplotype recherché, en l'occurrence H-2<sup>d</sup>.

#### EN CONCLUSION:

Trois hybridomes ont été obtenus présentant les caractéristiques des anticorps de type dit restreint, en ce sens qu'ils réagissent seulement avec des cellules spléniques d'un haplotype précis (H-2<sup>d</sup>) couvertes de peptide (NP 147-158R). Ces trois clônes

18

sont dénommés N6.6, S.2.2 et X5.3 d'isotype IgG<sub>2b</sub>,K, IgG<sub>3</sub>,K et IgG<sub>2b</sub>,K respectivement.

EFFETS IN VIVO D'UN ANTICORPS RESTREINT SPECIFIQUE DE PEPTIDE SUR LA CROISSANCE TUMORALE.

L'expérience a pour but de tester la capacité d'un anticorps restreint anti-peptide, d'inhiber la croissance in vivo des cellules tumorales ayant été mises en contact avec le peptide spécifique.

PROTOCOLE EXPERIMENTAL

Des souris DBA/2 (H-2<sup>d</sup>) sont réparties en 4 groupes comportant chacun quatre souris. Elles ont reçu, par injection sous-cutanée, une suspension de cellules du mastocytome P815 (il s'agit de cellules tumorales transplantables qui, une fois injectées aux hôtes syngéniques (souris DBA/2) provoquent le développement d'une tumeur létale).

Dans le 1er groupe, des cellules p815 seules sont injectées aux souris DBA/2, ce groupe sert de témoin de croissance des cellules P815 sur l'hôte syngénique.

Les souris du second groupe ont reçu des cellules P815 en mélange avec l'anticorps restreint à raison de 5 µg/10<sup>6</sup> cellules (il s'agit de l'anticorps X5.3, sous clone X.5.3.7.T). Ces souris servent de témoins ayant reçu des cellules et des anticorps seuls.

Les souris du 3ème groupe ont reçu des cellules P815 incubées pendant 1 heure à 37°C avec le peptide NPR de la nucléoprotéine du virus grippal à raison de 10 µg/10<sup>6</sup> cellules. C'est le groupe témoin ayant reçu les cellules et le peptide seul.

Les souris du 4ème groupe ont reçu des cellules P815 incubées avec le peptide et mises ensuite en présence de l'anticorps restreint X5.3.7.T dans les mêmes conditions et proportions que les groupes témoins 2 et 3.

Un même nombre de cellules P815 ( $10^5$  cellules/souris) est injecté à chaque souris qui est suivie individuellement quant au développement d'une tumeur sous-cutanée. Les résultats sont exprimés d'une part en diamètre moyen des tumeurs pour chaque groupe, en pourcentage de souris présentant une tumeur visible et enfin en pourcentage de tumeurs létales.

### RESULTATS

#### 1) Evolution des tumeurs sur l'hôte syngénique injecté avec les cellules P815

Le développement de la tumeur sur les souris DBA/2 injectées avec différentes préparations est représenté par la courbe des diamètres moyens des tumeurs de chaque groupe en fonction du temps (figure 1).

En particulier on peut noter, au 24ème jour après l'injection des cellules :

- la présence de 4 tumeurs sur 4 souris dans chacun des trois groupes témoins (cellules P815 seules, cellules P815 + anticorps seuls, cellules P815 + peptide seul), avec un diamètre moyen de 7,5; 10,25 et 7,75 mm respectivement.

- la présence de deux tumeurs sur 4 souris dans le groupe expérimental (cellules P815 + peptide + anticorps) avec un diamètre moyen de 4,5 mm.

#### 2) Développement des tumeurs létales

Le nombre de tumeurs létales pour chaque groupe en fin d'expérience est le suivant :

Groupe 1 (cellules P815 seules) : 3/4

Groupe 2 (cellules P815 + anticorps seuls) : 4/4

Groupe 3 (cellules P815 + peptide seul) : 4/4

Groupe 4 (cellules P815 + peptide + anticorps) : 2/4.

Pour l'ensemble des témoins (groupe 1 + 2 + 3) on observe : 11 tumeurs létales sur 12, soit un

pourcentage de 92% comparé à 2 tumeurs sur 4 ou 50% pour le groupe expérimental.

HYBRIDOMES SECRETANT DES ANTICORPS RESTREINTS ANTI-PEPTIDE DE L'ALBUMINE DE L'OEUF DE POULE OVA<sub>253-273</sub> OU I20K ASSOCIE A H-2 K<sup>b</sup>.

Ce peptide OVA<sub>253-273</sub> ou plus simplement I20K de 20 acides aminés dont la composition est la suivante IINFEKLTWTSSNVMEERK est reconnu en association avec la molécule CMH de classe I (H-2 K<sup>b</sup>) par les lymphocytes T cytotoxiques spécifiques (Carbone et Bevan, J. Exp. Med., 1989, 169:603; J. Exp. Med., 1990, 171:377).

En utilisant le même procédé que celui décrit pour le peptide du virus grippal NPR un hybridome (9.3.2) a été obtenu, qui reconnaît en test ELISA et en test de cytotoxicité complément dépendante, le peptide I20K en présence de lymphocytes exprimant H-2 K<sup>b</sup>. Les témoins constitués soit par des cellules exprimant H-2 K<sup>b</sup> en l'absence du peptide ou des préparations où le peptide (I20K) est incubé avec des cellules portant un haplotype différent (H-2 K<sup>d</sup>) ne sont pas reconnus.

Les études relatives à ces anticorps monoclonaux restreints anti-peptide OVA<sub>253-273</sub> reprennent les mêmes schémas expérimentaux que ceux appliqués dans l'étude des anticorps restreints anti-peptide NPR. De plus il est particulièrement intéressant dans le cas de la molécule K<sup>b</sup> de pouvoir étudier la reconnaissance du peptide en association avec les molécules K<sup>b</sup> (K<sup>bm</sup>) mutantes provenant des souris de la série C57Bl/6.

TECHNIQUES UTILISEES DANS L'ETUDE DES ANTICORPS RESTREINTS, AUTRES QUE CELLES DECRITES PRECEDEMMENT

1) Cytotoxicité complément dépendante utilisant des cibles marquées au <sup>51</sup>Cr

La technique dérivant de celle utilisée par Cerottini et al dans l'étude de la cytolyse à médiation cellulaire ou CMC a été appliquée (Cerottini et al, 1974, J. Exp. Med., 140 : 703). Brièvement les cellules cibles (cellules du CMH d'haplotype déterminé + peptide) sont marquées par le chrome (Cr) radioactif 51 sous forme de chromate de sodium ( $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ ). On incube les cellules cibles (ou les cellules témoins sans peptide) en présence du monoclonal spécifique. Le pourcentage de lyse spécifique est déduit en mesurant le chrome radioactif libéré dans le surnageant. Dans le cas des expériences avec l'anticorps monoclonal restreint X5.3 la technique a été modifiée en ajoutant un anticorps secondaire, en l'occurrence, l'anticorps de Lapin anti-Immunglobuline de Souris. Ensuite est ajouté le complément de Lapin. L'anticorps secondaire ayant reconnu l'anticorps X5.3, active le complément qui permet la lyse. A titre d'exemple, dans notre cas, l'anticorps restreint dénommé X5.3, sous-clone X5.5.7/T lyse 30% de cibles spécifiques (cellules P815-H-2<sup>d</sup> + peptide) et 0% quand les cellules P815 ne sont pas mises au contact préalable avec le peptide.

2) Immunoprécipitation après marquage de surface par l'iode radioactif 125

Des cellules cibles (cellules + peptide) ou témoins, (cellules sans peptide) sont marquée à l'iode radioactif 125 par la méthode utilisant l'enzyme lactoperoxydase (Marchalonis, J.J., Biochem. J., 1969, 113 : 291). Après marquage, les cellules sont lysées par un détergent, le Triton X-100 en présence d'inhibiteurs d'enzyme. Le lysat est incubé avec un anticorps non-relié (anticorps témoin) en présence des billes de sépharose-protéine A. Après centrifugation, le lysat est incubé avec l'anticorps spécifique (anticorps restreint). Le complexe est adsorbé sur

billes de sépharose-protéine A, lavé, récupéré et analysé en électrophorèse sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE).

Les résultats ont montré que l'anticorps restreint donne une bande de précipitation, après autoradiographie, quand les cellules portant l'haplotype correspondant sont incubées avec le peptide. (En l'absence du peptide les résultats, pour cette expérience, sont extrêmement faibles mais ne semblent pas absolument négatifs).

3) Utilisation de la molécule H-2 soluble obtenu par génie génétique et vidée de son contenu peptidique

Une molécule H-2 soluble (dépourvue de la partie transmembranaire) obtenue par génie génétique a été produite et vidée de son peptide endogène. Elle est utilisée pour loger à l'intérieur le peptide de la nucléoprotéine du virus grippal. Cette molécule sert de cible pour l'anticorps restreint dans la technique ELISA ou radioimmuno-essai (RIA) utilisant la protéine A marquée à l'iode 125 par exemple.



REVENDICATIONS

- 1/ Anticorps monoclonaux restreints caractérisés par leur capacité à reconnaître spécifiquement un complexe formé par un peptide caractéristique d'un antigène d'un agent pathogène ou un peptide caractéristique d'une dérégulation cellulaire et par une molécule du Complexe Majeur d'Histo-compatibilité (CMH) ayant la capacité de reconnaître et de fixer ce peptide, lesdits anticorps étant des anticorps monoclonaux restreints, dès lors qu'ils ne reconnaissent pas ledit peptide en association avec une molécule de CMH d'haplotype non spécifique du peptide.
- 2/ Anticorps monoclonaux restreints selon la revendication 1, caractérisés en ce qu'ils sont dépourvus ou pratiquement dépourvus de réaction à l'égard du peptide seul et/ou en ce qu'ils reconnaissent faiblement ou pas du tout la molécule du CMH seule.
- 3/ Anticorps monoclonaux restreints selon la revendication 1 ou la revendication 2, caractérisés en ce que les peptides reconnus sont caractéristiques d'agents pathogènes des virus, des bactéries, des parasites par exemple le plasmodium, des champignons, notamment des levures pathogènes, ou des peptides représentant des antigènes mineurs d'histo-compatibilité, des antigènes spécifiques de tumeurs ou des antigènes spécifiques de dérèglements autoimmuns.
- 4/ Anticorps monoclonaux restreints selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisés en ce que les peptides reconnus présentent de 7 à 25, de préférence une dizaine d'acides aminés.
- 5/ Anticorps monoclonaux restreints selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisés en ce que le peptide reconnu est spécifique d'un rétrovirus humain HIV et notamment en ce qu'il s'agit

de peptides de la protéine gag, de la nucléoprotéine ou du peptide K16F.

6/ Anticorps monoclonaux restreints selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisés en ce que la molécule du CMH reconnue est de différents haplotypes de classe I comme de classe II.

7/ Procédé pour la préparation d'anticorps monoclonaux restreints selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que:

- on fusionne des cellules spléniques d'un animal préalablement immunisé avec des cellules spléniques isogéniques recouvertes d'un peptide déterminé, avec des cellules de myélome en présence d'un promoteur de fusion, par exemple le polyéthylène glycol, les cellules spléniques étant en excès par rapport aux cellules myélomateuses, par exemple dans une proportion de 10 pour 1 environ,

- on réalise un criblage afin de sélectionner ceux des hybridomes capables de produire des anticorps monoclonaux restreints, par exemple par la technique ELISA effectuée avec un réactif à base d'anticorps conjugué anti-Ig de souris couplé à une enzyme par exemple l'uréase ou la phosphatase alcaline ou la peroxydase,

- on récupère et on clone les hybridomes ainsi sélectionnés.

8/ Hybridomes tels qu'obtenus par fusion de cellules de myélomes et de cellules spléniques d'un animal préalablement immunisé avec le peptide contre lequel on souhaite produire des anticorps monoclonaux restreints, dans des conditions telles que l'antigène contre lequel sont formés les anticorps, est constitué par un complexe comportant le peptide ci-dessus associé à une molécule de CMH qui le reconnaît spécifiquement.

9/ Composition pour le diagnostic de la présence de peptides associés à des molécules de CMH, dans un échantillon biologique ou dans un organisme vivant, caractérisée en ce qu'elle comprend des anticorps monoclonaux restreints selon l'une quelconque des revendications 1 à 6.

10/ Composition pour le diagnostic selon la revendication 9, caractérisée en ce qu'elle permet de détecter une infection par un agent pathogène, notamment un virus.

11/ Composition pour le diagnostic selon la revendication 9, caractérisée en ce qu'elle permet la détection de tumeurs.

12/ Composition pour le diagnostic selon la revendication 9, caractérisée en ce qu'elle permet la détection de dérèglements autoimmuns.

13/ Anticorps monoclonaux selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisés en ce qu'ils sont couplés à des substances capables de les rendre cytotoxiques par exemple à une toxine, un antibiotique ou un isotope radioactif.

14/ Composition pharmaceutique, caractérisée en ce qu'elle comprend à titre de principe actif, des anticorps monoclonaux restreints selon la revendication 13.

15/ Kit pour le diagnostic in vitro sur un échantillon biologique d'une infection par un organisme pathogène ou pour le diagnostic d'un cancer, d'une maladie autoimmune ou d'un autre dérèglement cellulaire, caractérisé en ce qu'il comprend:

- des anticorps monoclonaux restreints selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, ayant la spécificité recherchée compte tenu du diagnostic à effectuer,

- des moyens pour révéler la présence d'un conjugué de type complexe (antigène-molécule du CMH) lié avec l'anticorps.

16/ Composition pharmaceutique comprenant à titre de principe actif, des anticorps monoclonaux restreints selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, pour la modulation de l'action de cellules T, notamment dans les pathologies autoimmunes.

17. Composition vaccinnante caractérisée en ce qu'elle comprend à titre de principe actif, des anticorps monoclonaux restreints selon l'une quelconque des revendications 1 à 6.

1/2

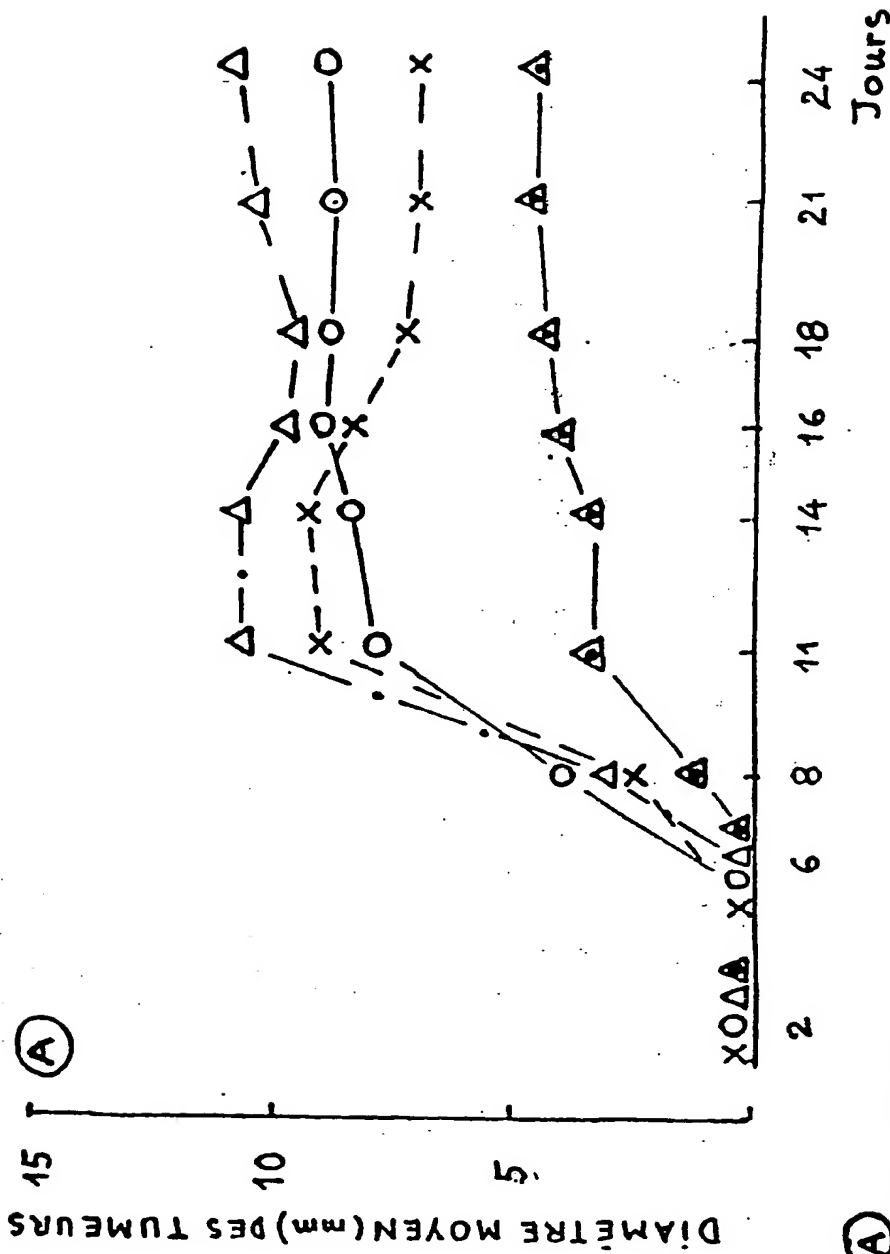


FIGURE 1 (A)

(A) Greffe P815 + :

Groupe 1 (X) : O + O

Groupe 2 (O) : X53.7T + O

Groupe 3 (Δ) : O + NPR<sup>-</sup>

Groupe 4 (▲) : X53.7T + NPR<sup>-</sup>

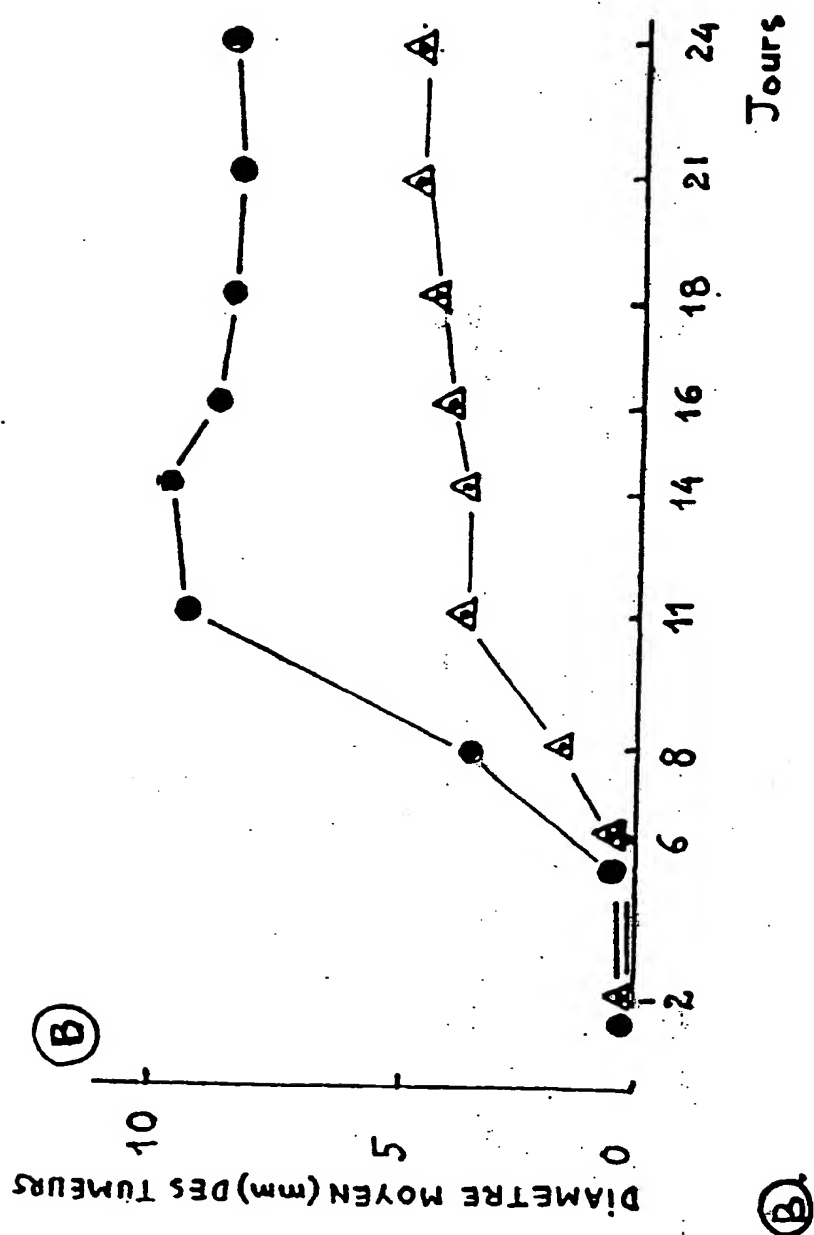


FIGURE 1 (B)

(●): moy. de (X + O + Δ)

(Δ): X5.3.7.T + NPA-

FEUILLE DE REMPLACEMENT

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/FR 91/00121

<b>I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> (If several classification symbols apply, indicate all) *		
According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC		
Int. Cl. <sup>5</sup> C 12 P 21/08, G 01 N 33/577, A 61 K 39/395, A 61 K 45/05		
<b>II. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum Documentation Searched <sup>7</sup>		
Classification System	Classification Symbols	
Int. Cl. <sup>5</sup>	C 12 P, C 07 K	
Documentation Searched other than Minimum Documentation to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched *		
<b>III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT *</b>		
Category *	Citation of Document, <sup>11</sup> with indication, where appropriate, of the relevant passages <sup>12</sup>	Relevant to Claim No. <sup>13</sup>
A	EP, A, 0226069 (BEHRINGWERKE AG) 24 June 1987  -----	
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p>* Special categories of cited documents: <sup>10</sup></p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.</p> <p>"&amp;" document member of the same patent family</p> </div> </div>		
<b>IV. CERTIFICATION</b>		
Date of the Actual Completion of the International Search		Date of Mailing of this International Search Report
25 April 1991 (25.04.91)		11 June 1991 (11.06.91)
International Searching Authority		Signature of Authorized Officer
European Patent Office		

FR 9100121  
SA 45463

EPO FORM 30479

**EPO** For more details about this annex : see Official Journal of the European Patent Office, No. 12/82



# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale N° PCT/FR 91/00121

<b>I. CLASSEMENT DE L'INVENTION</b> (si plusieurs symboles de classification sont applicables, les indiquer tous) <sup>7</sup>		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB <b>CIB<sup>5</sup> :</b> C 12 P 21/08, G 01 N 33/577, A 61 K 39/395, A 61 K 45/05		
<b>II. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTÉ</b>		
Documentation minimale consultée <sup>8</sup>		
Système de classification	Symboles de classification	
CIB <sup>5</sup>	C 12 P, C 07 K	
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où de tels documents font partie des domaines sur lesquels la recherche a porté <sup>9</sup>		
<b>III. DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS</b> <sup>10</sup>		
Catégorie <sup>*</sup>	Identification des documents cités, <sup>11</sup> avec indication, si nécessaire, des passages pertinents <sup>12</sup>	N° des revendications visées <sup>13</sup>
A	EP, A, 0226069 (BEHRINGWERKE AG) 24 juin 1987  -----	
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p><sup>*</sup> Catégories spéciales de documents cités: <sup>11</sup></p> <p>« A » document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent</p> <p>« E » document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date</p> <p>« L » document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)</p> <p>« O » document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens</p> <p>« P » document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée</p> </div> <div style="width: 50%;"> <p>« T » document ultérieur publié postérieurement à la date de dépôt international ou à la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention</p> <p>« X » document particulièrement pertinent: l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive</p> <p>« Y » document particulièrement pertinent: l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier.</p> <p>« &amp; » document qui fait partie de la même famille de brevets</p> </div> </div>		
<b>IV. CERTIFICATION</b>		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée <div style="text-align: center; font-weight: bold;">25 avril 1991</div>	Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale <div style="text-align: center; font-weight: bold;">11.06.91</div>	
Administration chargée de la recherche internationale <div style="text-align: center; font-weight: bold;">OFFICE EUROPEEN DES BREVETS</div>	Signature du fonctionnaire autorisé <div style="text-align: center;">   <b>M. SOTELO</b> </div>	

FR 9100121  
SA 45463

**EPO FORM 10472**

**Pour tout renseignement concernant cette annexe : voir Journal Officiel de l'Office européen des brevets, No.12/82**